

| | | | | | | | |
|---|---|----------------|----------|-----------------|-------------|---|---------------|
|  | GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS | | | | |    | |
| | CARTA DE AUTORIZACIÓN | | | | | | |
| CÓDIGO | AP-BIB-FO-06 | VERSIÓN | 1 | VIGENCIA | 2016 | PÁGINA | 1 de 2 |

Neiva, 10 de Marzo de 2016

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El suscrito:

Mario Alberto Caviedes Cleves , con C.C. No. 1.075.277.707

autor de la tesis y/o trabajo de grado

titulado: Creación de un ELISA de bajo costo para detección de inmunoglobulina M dengue-específica en plasma como método diagnóstico.

presentado y aprobado en el año 2016 como requisito para optar al título de Médico ;

autorizo al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.

- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.

- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

| | | | | | | | |
|---|---|----------------|----------|-----------------|-------------|---------------|---|
|  | GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS | | | | | |    |
| | CARTA DE AUTORIZACIÓN | | | | | | |
| CÓDIGO | AP-BIB-FO-06 | VERSIÓN | 1 | VIGENCIA | 2016 | PÁGINA | 2 de 2 |

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores” , los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

Firma: 

Mario Alberto Caviedes Cleves

C.C. 1075277707 de Neiva

| | | | | | | | |
|---|---|----------------|----------|-----------------|-------------|---------------|---|
|  | GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS | | | | | |    |
| | DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO | | | | | | |
| CÓDIGO | AP-BIB-FO-07 | VERSIÓN | 1 | VIGENCIA | 2016 | PÁGINA | 1 de 3 |

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Creación de un ELISA de bajo costo para detección de inmunoglobulina M dengue-específica en plasma como método diagnóstico.

AUTOR O AUTORES:

| Primero y Segundo Apellido | Primero y Segundo Nombre |
|----------------------------|--------------------------|
| Caviedes Cleves | Mario Alberto |

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

| Primero y Segundo Apellido | Primero y Segundo Nombre |
|----------------------------|--------------------------|
| Castro Betancourt | Dolly |

ASESOR (ES):

| Primero y Segundo Apellido | Primero y Segundo Nombre |
|----------------------------|--------------------------|
| Narvárez Rojas | Carlos Fernándo |

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Médico

FACULTAD: Salud

PROGRAMA O POSGRADO: Medicina

CIUDAD: Neiva **AÑO DE PRESENTACIÓN:** 2015 **NÚMERO DE PÁGINAS:** 46

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas X Fotografías___ Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general___
 Grabados___ Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___
 Retratos___ Sin ilustraciones___ Tablas o Cuadros X

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:

| | | | | | | | |
|---|---|----------------|----------|-----------------|-------------|---------------|---|
|  | GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS | | | | | |    |
| | DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO | | | | | | |
| CÓDIGO | AP-BIB-FO-07 | VERSIÓN | 1 | VIGENCIA | 2016 | PÁGINA | 2 de 3 |

MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN (*En caso de ser LAUREADAS o Meritoria*):

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

| Español | Inglés |
|------------------------|------------------|
| 1. Dengue | Dengue |
| 2. Elisa | Elisa |
| 3. Plasma | Plasma |
| 4. Inmunoglobulina M | Immunoglobulin M |
| 5. Reactividad cruzada | Cross- Reactive |

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

El dengue es la enfermedad transmitida por vectores más importante a nivel mundial. Su diagnóstico requiere confirmación por laboratorio y la detección de inmunoglobulina (Ig) M específica de virus dengue (DENV) por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) es un ensayo frecuentemente usado. Sin embargo, estuches comerciales de ELISA de captura IgM para el diagnóstico de dengue son costosos y no fácilmente disponibles en áreas endémicas. Aquí se propuso desarrollar un ELISA de captura para detección de IgM específica de DENV en plasma para el diagnóstico de dengue. Plasma de dos niños con infección aguda por dengue confirmada fue evaluada y dos anticuerpos monoclonales anti-DENV hechos en ratón (uno tipo-específico y el otro serotipo-Cross-reactivo) fueron evaluados. El ensayo demostró eficiencia en la detección de IgM específica de DENV y fue comparable con un estuche comercialmente disponible, incluso a las mayores diluciones de la muestra y de los anticuerpos anti-DENV hechos en ratón. Adicionalmente, en un niño con infección primaria por DENV-2, la IgM específica de DENV en plasma fue serotipo-específica. Éste trabajo fortalece la capacidad tecnológica para el estudio y diagnóstico de la infección por dengue en un área endémica.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS

DESCRIPCIÓN DE LA TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO



CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2016

PÁGINA

3 de 3

Dengue is the most important vector-borne viral disease worldwide. Its diagnosis requires laboratory confirmation and detection of dengue virus (DENV)-specific immunoglobulin (IgM) by capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is a frequently used assay. However, commercial kits of IgM-capture ELISA for dengue diagnosis are expensive and not easily available in endemic areas. Here we aimed to develop an in-house capture ELISA for detection of DENV-specific IgM in plasma for diagnosis of dengue infection. Plasma from two children with confirmed acute dengue infection was evaluated and two mouse monoclonal anti-DENV antibodies (one type-specific and the other one serotype-cross-reactive) were tested. The developed assay showed efficiency in the detection of DENV-specific IgM in plasma and was comparable with a commercially available kit, even at the highest dilutions of the sample and the mouse anti-DENV antibodies. Furthermore, in a child with primary DENV-2 infection, plasma anti-DENV IgM was found to be serotype-specific. This work strengthens the technical capacity for the study and diagnosis of dengue infection in an endemic area.

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado:

Firma:

Nombre Jurado:

Firma:

Nombre Jurado:

Firma:

CREACIÓN DE UN ELISA DE BAJO COSTO PARA DETECCIÓN DE
INMUNOGLOBULINA M DENGUE-ESPECÍFICA EN PLASMA COMO MÉTODO
DIAGNÓSTICO

MARIO ALBERTO CAVIEDES CLEVES

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA
NEIVA-HUILA
2016

CREACIÓN DE UN ELISA DE BAJO COSTO PARA DETECCIÓN DE
INMUNOGLOBULINA M DENGUE-ESPECÍFICA EN PLASMA COMO MÉTODO
DIAGNÓSTICO

MARIO ALBERTO CAVIEDES CLEVES

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de médico

Asesor

CARLOS FERNÁNDO NARVAEZ ROJAS

Médico; Médico especialista en Microbiología con énfasis en Inmunología;
Doctorado en ciencias biológicas – Inmunología.

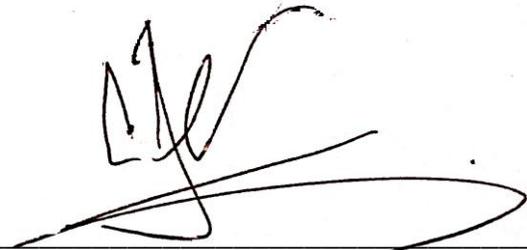
UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA
NEIVA-HUILA
2016

Nota de aceptación:

Aprobado por el jurado y asesor en la elaboración del proyecto de grado, en cumplimiento de los requisitos exigidos por la Universidad Surcolombiana para optar por el título de Médico.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dolly Castro', with a long horizontal flourish extending to the right. The signature is positioned above a solid horizontal line.

Dolly Castro Betancourt
Firma del jurado

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'CFNR', with a large, sweeping flourish underneath. The signature is positioned above a solid horizontal line.

Carlos Fernando Narvárez Rojas
Firma del asesor

DEDICATORIA

A mis padres Tarquino Caviedes Vargas y Stella Cleves Ramos, por su amor, sacrificio y entrega en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y ser lo que soy actualmente, todos mis logros se los debo a ustedes.

A mis hermanos Yeperson y Jhon, que han estado conmigo en todo momento y por el apoyo que me brindaron día a día. Es un privilegio ser parte de esta familia.

Mario Alberto

AGRADECIMIENTOS

A la universidad Surcolombiana por abrirme sus puertas y haberme permitido ser parte de ella.

A los docentes que me han acompañado a lo largo de mi carrera y me han brindado su apoyo.

Al Dr. Carlos Fernández Rojas, quien fue mi asesor en este trabajo de grado y me brindó sus conocimientos y me impulsó a entrar en el campo de la ciencia y la investigación.

A Federico Perdomo Celis, quien con su conocimiento y destrezas en el laboratorio me colaboró en el desarrollo de los experimentos del presente proyecto.

Y finalmente a la Profesora Dolly Castro Betancourt, que con su paciencia y gran capacidad de docencia me dirigió y apoyó en la elaboración de este documento.

Mil gracias.

CONTENIDO

| | pág. |
|--|------|
| INTRODUCCIÓN | 13 |
| 1 ANTECEDENTES | 15 |
| 2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 19 |
| 3 JUSTIFICACIÓN | 23 |
| 4 OBJETIVOS | 24 |
| 4.1 OBJETIVO GENERAL | 24 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 24 |
| 5 MARCO TEÓRICO | 25 |
| 6 DISEÑO METODOLÓGICO | 30 |
| 6.1 TIPO DE ESTUDIO | 30 |
| 6.2 LUGAR | 30 |
| 6.3 POBLACIÓN Y MUESTRA | 30 |
| 6.4 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS | 31 |
| 6.4.1 Materiales | 31 |
| 6.4.1.1 Reactivos | 31 |
| 6.4.1.2 Equipos | 32 |
| 6.4.1.3 Muestra | 32 |
| 6.4.2 Metodología | 32 |

| | pág. |
|--|------|
| 6.5 INSTRUMENTO PARA RECOLECCIÓN DE LA INFORMACIÓN | 35 |
| 6.6 PRUEBA PILOTO | 35 |
| 6.7 CODIFICACIÓN Y TABULACIÓN | 36 |
| 6.8 PLAN DE ANÁLISIS | 36 |
| 6.9 CONSIDERACIONES ÉTICAS | 36 |
| 7 ANÁLISIS DE RESULTADOS | 38 |
| 8 DISCUSIÓN | 42 |
| 9 CONCLUSIONES | 44 |
| 10 RECOMENDACIONES | 45 |
| BIBLIOGRAFÍA | 46 |
| ANEXOS | 47 |
| Anexo A. Instrumento de medición | 48 |
| Anexo B. Codificación y tabulación | 49 |
| Anexo C. Cronograma de actividades | 53 |
| Anexo D. Presupuesto | 54 |
| Anexo E. Operacionalización de variables | 55 |

LISTA DE TABLAS

| | pág. |
|---|------|
| Tabla 1. Características socioepidemiológicas de los pacientes | 31 |
| Tabla 2. Densidades ópticas obtenidas en la lectura por espectrofotómetro | 38 |

LISTA DE FIGURAS

| | pág. |
|---|------|
| Figura 1. Determinación de las concentraciones funcionales de anticuerpos murinos anti-denv | 39 |
| Figura 2. Comparación de la eficiencia entre el elisa de captura para detección de IgM DENV-específica y kit de ELISA disponible comercialmente | 40 |
| Figura 3. La IgM serotipo-específica para DENV fue detectada en infección primaria | 41 |

LISTA DE ANEXOS

| | pág. |
|--|------|
| Anexo A. Instrumento de medición | 48 |
| Anexo B. Codificación y tabulación | 49 |
| Anexo C. Cronograma de actividades | 53 |
| Anexo D. Presupuesto | 54 |
| Anexo E. Operacionalización de variables | 55 |

RESUMEN

El dengue es la enfermedad transmitida por vectores más importante a nivel mundial. Su diagnóstico requiere confirmación por laboratorio y la detección de inmunoglobulina (Ig) M específica de virus dengue (DENV) por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) es un ensayo frecuentemente usado. Sin embargo, estuches comerciales de ELISA de captura IgM para el diagnóstico de dengue son costosos y no fácilmente disponibles en áreas endémicas. Aquí se propuso desarrollar un ELISA de captura para detección de IgM específica de DENV en plasma para el diagnóstico de dengue. Plasma de dos niños con infección aguda por dengue confirmada fue evaluada y dos anticuerpos monoclonales anti-DENV hechos en ratón (uno tipo-específico y el otro serotipo-Cross-reactivo) fueron evaluados. El ensayo demostró eficiencia en la detección de IgM específica de DENV y fue comparable con un estuche comercialmente disponible, incluso a las mayores diluciones de la muestra y de los anticuerpos anti-DENV hechos en ratón. Adicionalmente, en un niño con infección primaria por DENV-2, la IgM específica de DENV en plasma fue serotipo-específica. Éste trabajo fortalece la capacidad tecnológica para el estudio y diagnóstico de la infección por dengue en un área endémica.

Palabras claves: Dengue, ELISA, plasma, inmunoglobulina M, Reactividad cruzada.

ABSTRACT

Dengue is the most important vector-borne viral disease worldwide. Its diagnosis requires laboratory confirmation and detection of dengue virus (DENV)-specific immunoglobulin (Ig) M by capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is a frequently used assay. However, commercial kits of IgM-capture ELISA for dengue diagnosis are expensive and not easily available in endemic areas. Here we aimed to develop an in-house capture ELISA for detection of DENV-specific IgM in plasma for diagnosis of dengue infection. Plasma from two children with confirmed acute dengue infection was evaluated and two mouse monoclonal anti-DENV antibodies (one type-specific and the other one serotype-cross-reactive) were tested. The developed assay showed efficiency in the detection of DENV-specific IgM in plasma and was comparable with a commercially available kit, even at the highest dilutions of the sample and the mouse anti-DENV antibodies. Furthermore, in a child with primary DENV-2 infection, plasma anti-DENV IgM was found to be serotype-specific. This work strengthens the technical capacity for the study and diagnosis of dengue infection in an endemic area.

Keywords: Dengue, ELISA, plasma, immunoglobulin M, cross-reactive.

INTRODUCCIÓN

La infección por DENV causa un amplio espectro de enfermedades, que van desde un cuadro subclínico hasta una enfermedad severa. El diagnóstico precoz y preciso de la enfermedad es esencial para el control de los brotes de la infección. El diagnóstico integral del Dengue se hace con base en varios criterios, incluyendo el cuadro clínico, factores epidemiológicos y diversos métodos de laboratorio, basados fundamentalmente en la detección directa del virus o sus componentes, o en el análisis de la respuesta de anticuerpos generada frente al virus por medio de pruebas serológicas. Las pruebas serológicas más utilizadas para el diagnóstico de una infección por el DENV, incluyen el antígeno no estructural 1 (NS1), una glicoproteína secretada y muy conservada; y las pruebas serológicas indirectas para detección de anticuerpos IgM e IgG anti-dengue. Diversos estudios se han hecho, con el fin de evaluar el valor diagnóstico combinado de estas pruebas en el transcurso de la enfermedad mediante el uso de ELISA de captura para DENV tipo 1 (DENV1), ELISA de captura específico para NS1, y ELISA de captura para IgM e IgG, demostrando que la detección del antígeno NS1 puede acortar el período de ventana por los primeros días de la enfermedad; y que una combinación entre métodos que detectaran el antígeno NS1 y anticuerpos IgM mejoran y facilitan el diagnóstico. La ELISA para determinación de anticuerpos IgM e IgG antidengue ha demostrado ser óptima para la detección de infecciones primarias y secundarias.

El dengue grave se asocia con infecciones virales secuenciales, por lo que es importante clasificar serológicamente un caso de dengue como primario o secundario para evaluar el riesgo de sufrir un cuadro severo de la enfermedad. Dicha clasificación requiere una combinación de varias pruebas realizadas en diferentes etapas de la enfermedad, que no es muy práctico para el uso rutinario; sin embargo, para discriminar una infección primaria o subsecuente, la presencia de IgG virus específica es el marcador más usado, debido a que esta representa exposiciones previas al virus, lo que obliga regularmente a usar tanto la detección de IgM como la detección de IgG durante la infección, demandando más tiempo y recursos económicos en el diagnóstico.

El gran aumento en la incidencia de infecciones por DENV en el mundo, ha puesto en evidencia la necesidad de buscar métodos para el diagnóstico preciso, que sean simples, eficientes y rápidos desde el punto de vista serológico, epidemiológico, clínico y económico; estas características las reúne la detección de anticuerpos IgM dengue-específicos por el método de ELISA; que aunque no diferencian el serotipo infectante, son las más usados; razones por las cuales han surgido nuevas técnicas comerciales, con el fin de acelerar y hacer menos

laborioso el proceso de confirmación diagnóstica de pacientes que padecen esta enfermedad.

La idea de este proyecto surgió al encontrar en estudios preliminares que niños con infección primaria tienen significativamente más alta frecuencia de células secretoras de anticuerpos circulantes que los de infección secundaria, lo que conlleva a pensar que diferencias en la magnitud de la respuesta de IgM específica podría ser útil no sólo para la confirmación diagnóstica de la infección, sino que diferencias en sus niveles circulantes podría ser relevantes para diferenciar entre infecciones primarias de las secundarias, ahorrando la realización de un ELISA de detección de IgG. Para comprobar dicha hipótesis se estimarán las dosis óptimas de los anticuerpos a utilizar en un ELISA de detección de IgM dengue específica, y se probará la reactividad cruzada de la IgM humana plasmática específica para DENV, para desarrollar y estandarizar un protocolo para la detección de los niveles de IgM en plasma de bajo costo, el cuál eventualmente podría servir como método diagnóstico y para diferenciar y comparar dichos niveles en una infección primaria y subsecuente por el virus del dengue. Éste nuevo método podría ser utilizado para el diagnóstico de infecciones por el virus del dengue en zonas con recursos limitados donde el dengue es endémico.

1. ANTECEDENTES

En un estudio en El Salvador, realizado durante una gran epidemia de virus dengue-2 con muchos casos graves, se estimó que la frecuencia de infección reciente, documentada por la presencia de anticuerpos IgM o alto título de anticuerpos IgG para el virus de dengue, era de 9.8%, de los cuales al menos el 44% eran infecciones secundarias.¹

El diagnóstico precoz y preciso de la infección por dengue es esencial para el control de los brotes de la enfermedad. Desde hace algún tiempo, el antígeno no estructural 1 (NS1), una glicoproteína secretada y muy conservada, se ha venido utilizando como un marcador para el diagnóstico temprano del dengue. Las pruebas serológicas indirectas para detección de anticuerpos IgM e IgG anti-dengue, son aún los más utilizados para el diagnóstico de dicha infección. Diversos estudios se han hecho, con el fin de evaluar el valor diagnóstico combinado de estas pruebas, estudiando la presencia de NS1, y anticuerpos IgM e IgG virus-específico en el transcurso de la enfermedad mediante el uso de ELISA de captura para DENV tipo 1 (DENV1), ELISA de captura específico para NS1, y ELISA de captura para IgM e IgG. Uno de estos estudios demostró que la detección del antígeno NS1 puede acortar el período de ventana por los primeros días de la enfermedad; y que una combinación entre métodos que detectaran el antígeno NS1 y anticuerpos IgM mejoran y facilitan el diagnóstico.²

Es importante tener en cuenta que el diagnóstico precoz de la infección por dengue es crucial para un mejor manejo de la enfermedad. Por esta razón se dispone comercialmente de exámenes de diagnóstico basados en la detección del antígeno NS1, con diferente sensibilidad y especificidad observadas en diversos entornos. El dengue es endémico en Indonesia y los médicos están utilizando cada vez más la detección de NS1 para la confirmación del dengue. Un estudio describió el desempeño del ELISA de captura IgM y NS1 para etapas tempranas de la infección, para la detección del dengue durante la observación de ocho ciudades de Indonesia, así como la diversidad genética de NS1 y su relación con la detección de NS1. Lo que observaron básicamente es que había una sensibilidad relativamente baja de ELISA para NS1 para la detección del dengue

¹ HAYES, John M; et al. Risk factors for infection during a severe dengue outbreak in El Salvador in 2000. 2003. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol 69, p. 629–633.

² DONGMEI, Hu et al. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. 2011. *Virology Journal*, vol 8.

en muestras analizadas por RT-PCR positivas para la infección por dicho virus. La tasa de detección aumentó significativamente cuando se combinaron los métodos de detección de NS1 e IgM. En dicho estudio, la baja sensibilidad de detección del antígeno NS1 no guardaba relación con la diversidad genética NS1. Por el contrario, el rendimiento de la prueba de antígeno NS1 se vio afectada por el estado de infección de los pacientes y el origen geográfico de las muestras.³

La búsqueda de técnicas para la confirmación diagnóstica de Dengue y su reciente comercialización requieren su estudio en cuanto a sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, rapidez y costo. Estudios han comparado dos técnicas serológicas para el diagnóstico de esta infección, entre las que se encuentran la Inmunocromatografía (IC) e Inmunoensayo Enzimático (ELISA) para la determinación de anticuerpos IgM e IgG antidengue. Dichos estudios sugieren que el ELISA es óptima para la detección de infecciones primarias y secundarias, mientras que IC demostró ser más rápida y aplicable en caso de brotes y/o epidemias, sin embargo es menos sensible en el diagnóstico de infecciones secundarias por virus Dengue y consecuentemente menos adecuada para el seguimiento y detección de casos de Fiebre Hemorrágica por Dengue/Síndrome de Choque (FHD/SCD) en áreas endémicas.⁴

La infección por DENV causa un amplio espectro de enfermedades, que van desde un cuadro subclínico hasta una enfermedad severa. El dengue grave se asocia con infecciones virales secuenciales. Una definición estricta de infección primaria frente a infección secundaria requiere una combinación de varias pruebas realizadas en diferentes etapas de la enfermedad, que no es muy práctico para el uso rutinario. En un estudio se desarrolló un método simple para clasificar las infecciones de dengue como primarias o secundarias en función de los niveles de IgG-dengue específico. Una vez que se determinó la infección aguda por dengue por métodos virológicos, un clasificador de 2-D basado en kits IgG del virus del dengue distinguió de forma confiable las infecciones primarias y secundarias de dengue.⁵

³ ARYATI; et al. Performance of commercial dengue NS1 ELISA and molecular analysis of NS1 gene of dengue viruses obtained during surveillance in Indonesia. 2013. BMC Infectious Diseases, vol 13, p. 2-4.

⁴ VALERO, Nereida; et al. Comparación entre los métodos de cromatografía e inmunoensayo enzimático (ELISA) en el diagnóstico de dengue. 2006. Kasmera. Vol 34, p. 53-60.

⁵ TENORIO, Marli; et al. Reliable Classifier to Differentiate Primary and Secondary Acute Dengue Infection Based on IgG ELISA. 2009. PLoS ONE. vol 4, p. 1-11.

Varios ensayos han sido desarrollados para diagnosticar la infección por el virus del dengue, apoyándose en técnicas de los campos de la serología y biología molecular. Muchos de estos ensayos han sido un éxito, pero todavía hay una necesidad urgente de ensayos de diagnóstico, precisos, sencillos y rápidos para el diagnóstico de infección por el virus del dengue y para ayudar en el manejo del paciente. Utilizando un panel de sueros bien caracterizados y una colección de muestras retrospectivas obtenidas durante las epidemias de dengue que se produjeron en Belém, Brasil, entre 2002 y 2009, un estudio realizó una comparación entre un ELISA de captura específico para IgM modificada con el "Gold standard" MAC-ELISA, con el fin de evaluar la especificidad, sensibilidad, estabilidad, reproducibilidad y el costo-efectividad de este nuevo ensayo. Estos resultados demostraron que el MAC-ELISA modificado es comparable a la MAC-ELISA en términos de sensibilidad y especificidad y es altamente reproducible; Además, se lleva a cabo fácilmente, es menos costoso que otros formatos disponibles y se puede completar dentro de tres horas. Por otra parte, el MAC-ELISA modificado puede ser utilizado para el diagnóstico de infecciones por el virus del dengue en zonas con recursos limitados donde el dengue es endémico.⁶

El Salvador es un país de América Central, que ha sido afectada por varios brotes de dengue. Un estudio investigó los niveles de anticuerpos IgM, IgA, e IgE anti-dengue en muestras de suero de los niños en El Salvador, con un diagnóstico clínico y serológico de la infección por dengue durante la epidemia por dengue 4 en el período 2002-2003. Setenta y una muestras de suero se analizaron por ELISA y los casos fueron clasificados en tres grupos: 13 casos de dengue primario (PDF), 21 de dengue secundario (SDF), y 37 de dengue hemorrágico secundario (SDHF). Además, la especificidad de IgM anti-dengue para los diferentes serotipos fue probado. No se encontraron diferencias significativas en la respuesta IgM entre PDF y SDF, pero si entre PDF y SDHF, y entre SDF y SDHF. Los valores de IgA e IgE mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos primarios y secundarios. El porcentaje de positividad más alta de IgA fue entre 95% (SDF) y 100% (SDHF) hacia el día 7 de inicio de la fiebre. Todos los casos secundarios fueron positivos para anticuerpos IgE. La especificidad de IgM se determinó para DENV-4 en grupos DF primarias y secundarias. Este fue el primer estudio en casos de dengue en niños salvadoreños relacionados con la respuesta inmune de diferentes inmunoglobulinas para el tipo de infección y el cuadro clínico. Se necesitan más estudios prospectivos para definir si el patrón de

⁶ NUNES, Márcio R.T; et al. Evaluation of an immunoglobulin M-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for rapid diagnosis of dengue infection. 2010. Journal of Virological Methods. Vol 171, p. 14-20.

inmunoglobulinas puede determinar la infección por dengue temprana y / o gravedad⁷.

La idea de este proyecto surgió del hecho de encontrar que niños con infección primaria tienen significativamente más alta frecuencia de células secretoras de anticuerpos circulantes que los de infección secundaria, lo que conlleva a pensar que los niveles de IgM podrían ser útiles para la diferenciación de los dos tipos de infecciones.

⁷ VAZQUEZ, Susana; et al. Dengue Specific Immunoglobulins M, A, and E in Primary and Secondary Dengue 4 Infected Salvadorian Children. 2014. Journal of Medical Virology. Vol 86, p. 1576-1583.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El diagnóstico integral del Dengue se hace con base en varios criterios, entre los que se incluyen el cuadro clínico, factores epidemiológicos y diversos métodos de laboratorio, basados fundamentalmente en la detección directa del virus o sus componentes o en la el análisis de la respuesta de anticuerpos generada frente al virus.⁸

El gran aumento en la incidencia de infecciones por DENV en el mundo, ha puesto en evidencia la necesidad de buscar métodos para el diagnóstico preciso, que sean simples, eficientes y rápidos desde el punto de vista serológico, epidemiológico, clínico y económico; estas características las reúne la detección de anticuerpos IgM dengue-específicos por el método de ELISA; que aunque no diferencian el serotipo infectante, son las más usados; razones por las cuales han surgido nuevas técnicas comerciales, con el fin de acelerar y hacer menos laborioso el proceso de confirmación diagnóstica de pacientes que padecen esta enfermedad.

El Huila es un sitio que se encuentra en alerta epidemiológica debido al incremento de los casos de dengue. Dicha región encabeza los departamentos con el mayor número de casos de dengue a nivel nacional; además hay que tener en cuenta que la replicación del mosquito *Aedes Aegypti*, se favorece gracias al clima tropical, siendo el Huila, un departamento ideal para su supervivencia. Entre 2008 y 2013 se reportaron en Colombia un total de 346.952 casos, de los cuales 24.305 correspondían a casos graves; y donde 33 de los 37 municipios del Huila aportaron casos, siendo un departamento mesoendémico.

En Colombia a semana epidemiológica 32 del año 2014 el comportamiento de dengue se ubica en zona de alerta con 66265 casos totales de dengue, 64625 (98 %) de dengue y 1640 (2 %) de dengue grave, que a la fecha se encuentran distribuidos así: probables: 37292 (58 %) casos de dengue y 624 (38 %) de dengue grave; confirmados: 27333 (41 %) casos de dengue y 1016 (62 %) de dengue grave. En el departamento del Huila hasta el periodo VIII de 2014 se han reportado 4906 casos totales, con 4795 (98 %) de dengue y 112 (2 %) de dengue grave, que a la fecha se encuentran distribuidos así: probables: 2158 (35 %)

⁸ VALERO, Nereida; et al. Comparación entre los métodos de cromatografía e inmunoensayo enzimático (ELISA) en el diagnóstico de dengue. 2006. Kasma. Vol 34, p. 53-60.

casos de dengue y 10 (7 %) de dengue grave; confirmados: 2637 (65 %) casos de dengue y 102 (93 %) de dengue grave. El departamento se encuentra en zona de brote según el canal epidemiológico, a su vez un total de 12 municipios en Brote, 14 en zona de alerta, 6 en zona de seguridad y 5 en zona de éxito. Se han confirmado 2 muertes por dengue procedentes de Neiva y Yaguará; con estos resultados la letalidad del dengue en el nivel departamental es de 1,78% y para los municipios el 2,2% y el 12,5% de letalidad respectivamente. Por todo esto, se infiere que el Huila es un escenario ideal para el estudio de la enfermedad.⁹

Las técnicas de ELISA se caracterizan por tener una alta reproducibilidad, sensibilidad y especificidad diagnóstica para la determinación de anticuerpos IgM antidengue. La técnica cuenta con ciertas desventajas, que tienen que ver con el tiempo empleado para su ejecución, y que la determinación de anticuerpos IgM e IgG es por separado; no obstante, su alto valor diagnóstico es evidente en el monitoreo de infecciones primarias.

Actualmente no existe un método sencillo, rápido y confiable que se pueda utilizar de forma rutinaria para discriminar entre infecciones primarias y secundarias en los primeros días de una infección; sin embargo, para discriminar una infección primaria o subsecuente, la presencia de IgG virus específica es el marcador más usado, debido a que esta representa exposiciones previas al virus, lo que obliga regularmente a usar los dos marcadores durante la infección, demandando más tiempo y recursos económicos en el diagnóstico. Otras pruebas usadas ampliamente incluyen: 1) la inhibición de la hemaglutinación (HI), cuyo principio básico es determinar los títulos de anticuerpos inhibidores de hemaglutinación en sueros pareados, puesto que el DENV es capaz de aglutinar eritrocitos de ganso y de humano del grupo O, y como consecuencia, durante la infección por DENV se forman anticuerpos que se unen al virus e inhiben la hemaglutinación; de acuerdo a esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda este método para la clasificación serológica de infecciones de dengue, siendo un caso probable de dengue un paciente que presente títulos de anticuerpos por IHA igual o mayor que 1280; y un caso secundario de dengue una muestra tomada en período convaleciente (7 o más días después de iniciado los síntomas) y con un título igual o mayor a 2560, o que se encuentre en los 5 primeros días de la enfermedad y presente algún título de anticuerpo. Sin embargo, este ensayo es de mucho tiempo y se han observado reacciones cruzadas entre Flavivirus; por tanto una prueba serológica positiva nunca puede ser tomada totalmente como un criterio de

⁹ GOBERNACIÓN DEL HUILA, SECRETARÍA DE SALUD DEPARTAMENTAL. Boletín epidemiológico mensual 2014; periodo epidemiológico 08 (13 de Julio de 2014- 09 de Agosto de 2014), p. 1-30.

identificación del virus causante de la infección. 2) La prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT), es una técnica que tiene alta especificidad; en este caso los virus pueden ser aislados en cualquier sistema. Dicho método puede ser usado para la identificación viral (frente a un suero hiperinmune conocido a una dilución constante) o para conocer diferencias en el título neutralizante entre el suero de un paciente en fase aguda y un suero en fase convaleciente. Éste método genera resultados variables ya que éstos dependen de las cepas de virus y líneas celulares usadas, lo que limita su utilidad en la mayoría de los laboratorios, y el hecho de que los resultados tardan varios días para obtener tiende a limitar su utilidad clínica. 3) la inmunofluorescencia se basa en la unión de un anticuerpo marcado con un fluorocromo a su antígeno homólogo. Como la actividad inmunológica de estos anticuerpos no se altera, la capacidad de los mismos de unirse a los antígenos homólogos permanece íntegra. Ésta técnica se ha convertido en un método muy útil para el diagnóstico de dengue, debido a la alta especificidad de la reacción Ag-Ac; además el tiempo que se requiere es relativamente corto. Un aislamiento positivo confirma un caso de dengue.

La definición de las infecciones primarias y secundarias de dengue por medio de estos criterios rigurosos resulta muy costoso, y la mayoría de los laboratorios clínicos en los países donde el dengue es endémico no poseen la infraestructura necesaria para su realización, por tanto no pueden realizar de forma rutinaria todos estos ensayos. Incluso cuando todos los ensayos están disponibles, a causa de las fechas de las colecciones de sangre y las ventanas inmunológicas, no siempre es posible definir sin ambigüedades cuando nos encontramos ante una infección primaria o secundaria.

Estudios preliminares demuestran que niños con infección primaria tienen significativamente más alta frecuencia de células secretoras de anticuerpos circulantes que los de infección secundaria. No es completamente claro si los niveles de IgM dengue-específica son iguales en los dos tipos de infecciones; por lo tanto, se podría inferir que diferencias en la magnitud de la respuesta de IgM específica podría ser útil no solo para la confirmación diagnóstica de la infección sino que diferencias en sus niveles circulantes podría ser relevantes para diferenciar entre infecciones primarias de las secundarias, ahorrando la realización de un ELISA de detección de IgG. Para ello, es necesario estandarizar un ELISA para la detección de IgM dengue específica que sea útil para comparar los niveles de IgM durante una infección primaria y secundaria por el virus del dengue.

Se estimarán las dosis óptimas de los anticuerpos a utilizar en un ELISA de detección de IgM dengue específica, y se probará la reactividad cruzada de la IgM

humana plasmática específica para DENV, para estandarizar un protocolo para la detección de los niveles de IgM en plasma, el cuál eventualmente podría servir como método diagnóstico y para diferenciar y comparar dichos niveles en una infección primaria y subsecuente por el virus del dengue.

De acuerdo a esto, ¿Es posible desarrollar un ELISA propio para la detección de IgM dengue-específica plasmática eficiente y de bajo costo?

3. JUSTIFICACIÓN

La clasificación serológica de un caso de dengue como primario o secundario es muy útil para evaluar el riesgo de sufrir un cuadro severo de la enfermedad, puesto que se ha planteado que uno de los factores de riesgo para el dengue grave, se relaciona con la infección secundaria. Diferentes estudios han demostrado una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica para la determinación de anticuerpos IgM antidengue a través de las técnicas de ELISA e Inmuncromatografía; donde ELISA ha demostrado ser altamente sensible en contraste con la inmuncromatografía, en la detección de infecciones secundarias. En la actualidad, no existe ninguna prueba rápida, sencilla, fácil y económica que sea aceptable para hacer un diagnóstico definitivo de dengue; sin embargo, los métodos serológicos basados en la detección de los anticuerpos IgM e IgG, a pesar de que son métodos menos confiables que los virológicos, son más accesibles y por tanto más ampliamente utilizados en muchos laboratorios. La proteína NS1 es de gran importancia en el diagnóstico, constituyendo el principal marcador diagnóstico de infección temprana. Clásicamente se ha usado la IgM y la IgG como dos marcadores para distinguir una infección primaria de una secundaria, pero esto implica más tiempo y más costos. Una definición estricta de infección primaria frente a infección secundaria requiere una combinación de varias pruebas realizadas en diferentes etapas de la enfermedad, que no resulta muy práctico para el uso rutinario. Como consecuencia, se han ideado nuevas técnicas comerciales, con el fin de hacer menos laborioso y más rápido el proceso de confirmación diagnóstica de pacientes que padecen esta enfermedad. Además, el gran aumento en la incidencia de infecciones por DENV en todo el mundo, ha puesto en evidencia la gran necesidad de buscar nuevos métodos que sean rápidos, seguros y confiables para lograr un diagnóstico exacto y una vigilancia adecuada que permita el control del vector y el cese definitivo de la transmisión viral. Aún no es conocido si los niveles de IgM dengue-específica son iguales en el curso de una infección primaria o secundaria por DENV, por lo que las diferencias en la magnitud de la respuesta y las diferencias en los niveles circulantes de IgM dengue-específica sérica podría ser un marcador útil para la confirmación diagnóstica y para diferenciar ambos tipos de infecciones, ahorrando la realización de un ELISA de detección de IgG, lo que implicaría un mayor costo-beneficio en este tipo de diagnósticos. Éste nuevo método podría ser utilizado para el diagnóstico de infecciones por el virus del dengue en zonas con recursos limitados donde el dengue es endémico.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un protocolo para la detección de los niveles de IgM dengue-específica por ELISA de bajo costo para el diagnóstico de dengue.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Detectar la IgM humana plasmática específica para el virus del dengue.

Determinar la funcionalidad y dosis óptimas de los anticuerpos a usar para la creación de un ELISA para detección de IgM virus-específica.

Probar la reactividad cruzada de la IgM específica para dengue presente en las muestras.

5. MARCO TEÓRICO

El dengue es una enfermedad febril aguda de origen viral y de distribución mundial, cuya incidencia aumenta como consecuencia de la urbanización de zonas rurales, propiciando condiciones ideales para la replicación del vector, el mosquito *Aedes Aegypti*. El virus pertenece a la familia *Flaviviridae*, cuyo material genético se compone de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva. La enfermedad es causada por la infección con cualquiera de los 4 serotipos del complejo dengue denominados dengue 1 a dengue-4 (DENV-1 a DENV-4). En la mayor parte de los casos, las infecciones son asintomáticas o subclínicas. En Colombia se reportaron 346,952 casos de dengue entre 2008 y 2013, de ellos 24,305 correspondieron a casos graves; 33 de los 37 municipios del Huila aportaron a la casuística nacional, siendo considerado por tanto un Departamento mesoendémico.

En cuanto a la clínica, los grupos de mayor riesgo en pacientes con dengue incluyen las gestantes, niños menores de 5 años, la presencia de enfermedades crónicas (HTA, DM, EPOC, anemia, insuficiencia renal crónica, enfermedades cardiovasculares, enfermedad arterial periférica, enfermedades autoinmunes, etc); evidentemente los pacientes que viven solos y que tienen un difícil acceso a un servicio de salud y aquellos que viven en la pobreza extrema, pertenecen también a este grupo. Actualmente el dengue se clasifica según la OMS en: 1) dengue con signos de alarma, 2) dengue sin signos de alarma y 3) dengue grave. Los signos de alarma son: dolor abdominal intenso, vómitos persistentes, hipotensión postural/lipotimias, hepatomegalia dolorosa, hemorragias importantes (melenas, hematemesis), somnolencia o irritabilidad, disminución de la diuresis, disminución repentina de la temperatura/hipotermia, aumento del hematocrito y caída abrupta de plaquetas, y acumulación de líquidos (ascitis, derrame pleural, edema). Es importante reconocer también los signos de choque que ponen en peligro la vida del paciente, que son: presión arterial convergente (PA diferencial <20 mmHg), pulso rápido y fino, llenado capilar >2 segundos, extremidades frías y cianosis, e hipotensión arterial, pues su presencia indica que el paciente está crítico y que debe ser internado en UCI.¹⁰

Esta enfermedad consta de 3 fases clínicas: la primera de ella es la fase febril que ocurre en los primeros 4 días de iniciados los síntomas, y se caracteriza por

¹⁰ ROJAS, Diana Patricia; et al. Guía para la atención clínica integral del paciente con dengue, Bogotá 2010, Ministerio de protección social de la República de Colombia. p. 1-45

aumento de la viremia, aumento progresivo del hematocrito, disminución del recuento de plaquetas y deshidratación, además de fiebre de aproximadamente 40°. La segunda ocurre entre el día cuarto y sexto, es llamada fase crítica, pues es el periodo donde el individuo mayor riesgo tiene de hacer complicaciones, entre ellas la falla multiorgánica, shock y hemorragias severas; en esta fase, la temperatura, las plaquetas y el hematocrito pueden estar normales, y la IgM e IgG comienzan a aparecer. Durante una infección, la segunda fase puede estar ausente, y el individuo puede pasar directamente de la primera a la tercera fase, que es la fase de recuperación, donde hay reabsorción de líquidos y una mejoría evidente. Cabe resaltar que en esta última fase puede haber un signo de resolución, que es un brote en extremidades denominado “islas blancas en el mar rojo”.

Cuando un individuo no ha estado expuesto previamente al virus del dengue y es infectado por éste (primoinfección), se desarrolla una respuesta primaria de anticuerpos caracterizada por un aumento lento de anticuerpos específicos. La IgM es el primer isotipo de inmunoglobulina en aparecer y se produce transitoriamente; es posible detectarlos en el 50% de los pacientes 80% para el día 5, o a 99% para el día 10. Los niveles de IgM alcanzan el pico aproximadamente a las 3 semanas después de la aparición de los síntomas, y posteriormente, a los 2-3 meses declinan a niveles no detectables, razón por la cual su detección en una muestra de suero indica una infección activa o reciente. La IgG son bajas al final de la primera semana de la enfermedad, y desde entonces aumentan lentamente. Ésta respuesta mediada por IgG hacia la infección por el virus del dengue puede perdurar durante décadas e incluso de por vida. Durante una infección subsecuente, igualmente se producen anticuerpos IgM de forma transitoria. Los niveles de IgG dengue específica se elevan en mayor proporción de forma más precoz comparado con una infección primaria. En este caso la IgG es el isotipo de inmunoglobulina que predomina, y se detecta a niveles altos aún en la fase aguda y persisten por periodos que duran de 10 meses a toda la vida. Los primeros niveles de IgM en la etapa de convalecencia son significativamente más bajos en las infecciones secundarias que en las primarias y en algunos casos es posible no detectarlos. Los anticuerpos generados son específicos contra el serotipo del virus causante de la enfermedad, pero no protegen contra otro serotipo, de manera que durante infecciones subsecuentes se presenta reactividad cruzada con los diferentes serotipos. La producción de estos anticuerpos neutralizantes contra el virus del dengue resulta efectiva en el control de la infección, pero como ya mencionó, si se produce una infección secundaria con un serotipo diferente, se presenta el fenómeno denominado Amplificación dependiente de anticuerpos, el cuál favorece la interiorización de partículas virales opsonizadas por el receptor FCyRII en macrófagos y células dendríticas, lo cuál a su vez incrementa la transcripción/traducción de los genes

para IL-12, IFN- γ y TNF- α y promueve la expresión/síntesis de aquellos para IL-6 e IL-10.^{11 12}

Las técnicas de diagnóstico serológico son las más utilizadas a nivel internacional, particularmente aquellas en las que se determina la IgM dengue específica e IgG mediante ELISA u otros métodos. El estudio serológico para IgM no debe indicarse antes del 5to día, sino preferentemente a partir del 6to día. No constituye, por tanto, una ayuda al médico de asistencia para decidir conductas, pues el paciente puede agravar a partir del 3to ó 4to día. No obstante, es importante indicar estos estudios serológicos, pues el resultado de laboratorio completa el trípede diagnóstico junto con la clínica y la epidemiología.¹³

Es importante diferenciar cuando se está frente una infección primaria o subsecuente por el virus del dengue, puesto que estudios epidemiológicos han demostrado que hasta el 90% de las formas severas se presentan en infecciones subsecuentes. Para la identificación de estas dos, los criterios más utilizados son los serológicos. Una infección primaria se define como la ausencia de anticuerpos IgG anti-dengue específicas en las primeras muestras de suero obtenidas durante la fase aguda, con IgM anti-dengue positivo, y aislamiento del virus y/o ARN, con aparición de IgG virus-específica en la fase de convalecencia. En contraste, la infección secundaria por dengue se define por la presencia de IgG anti-dengue específica y la ausencia de IgM anti-dengue en la primera muestra (puede estar o no), junto con una RT-PCR positivos y/o el aislamiento del virus, seguido por la presencia de IgM anti-dengue en una muestra posterior.

Diversos estudios demuestran una alta sensibilidad y especificidad diagnóstica para la determinación de anticuerpos IgM antidengue a través de las técnicas de ELISA e Inmunocromatografía; por el contrario, ELISA ha demostrado ser altamente sensible en relación a la inmunocromatografía en la detección de infecciones secundarias.¹⁴

¹¹ CASTRO, Maria Eugenia; et al. Respuesta inmune e inmunopatogénesis en las infecciones con el virus del dengue. 2013. Gaceta Médica de México. Vol 149, p. 531-540.

¹² OMR y ETR. Dengue: guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. 2010, p. 1-151.

¹³ MARTINEZ, Eric. Dengue. 2008. Estudios Avanzados. Vol 22.

¹⁴ VALERO, Nereida; et al. Comparación entre los métodos de cromatografía e inmunoensayo enzimático (ELISA) en el diagnóstico de dengue. 2006. Kasmera. Vol 34, p. 53-60.

El diagnóstico integral del Dengue se basa en distintos elementos que incluyen: el cuadro clínico, factores epidemiológicos, y diversos métodos de laboratorio, basados fundamentalmente en el aislamiento e identificación viral, la detección del genoma por la técnica de TR-RCP, y las técnicas serológicas; cada uno de ellos con distintos grados de sensibilidad, especificidad y complejidad. El aislamiento viral y la RT-PCR son dos métodos que brindan un diagnóstico más confiable de la infección. No existe actualmente ninguna prueba rápida, sencilla, fácil y económica que pueda ser considerada aceptable para un diagnóstico definitivo de dengue; sin embargo, los métodos serológicos basados en la detección de los anticuerpos IgM e IgG, a pesar de que son métodos menos confiables, donde la reactividad cruzada de los anticuerpos puede generar dudas dentro del mismo género flavivirus, son más accesibles y por lo tanto más ampliamente utilizados en muchos laboratorios que no tienen todas las condiciones para desarrollar los métodos virológicos. La proteína NS1 es de gran importancia en el diagnóstico, debido a que es secretada al medio extracelular en la etapa virémica de la infección, constituyendo el principal marcador de infección temprana. La IgM y la IgG son dos marcadores ampliamente usados de igual forma para distinguir las distintas formas de la enfermedad, sea primaria o secundaria. Por todas estas razones, han surgido nuevas técnicas comerciales, con el fin de aligerar y hacer menos laborioso el proceso de confirmación diagnóstica de pacientes que padecen esta enfermedad. Además, el abrupto crecimiento en la incidencia de infecciones por DENV en el mundo, ha puesto en evidencia la necesidad de buscar métodos nuevos, rápidos, seguros y confiables para lograr un diagnóstico preciso y una vigilancia adecuada que permita el control del vector y el cese de la transmisión viral.

La prueba de ELISA IgG es usada para la detección de infecciones por dengue recientes o pasadas, sólo si se recolectan sueros pareados dentro del periodo correcto. Ésta prueba usa los mismos antígenos que la prueba MAC-ELISA. El uso de este tipo de ELISA para la captura de IgG específico para envoltura y membrana permite la detección de IgG durante un periodo de 10 meses después de la infección. Ante una infección primaria, este método detectará la aparición de anticuerpos IgG no presentes en muestras anteriores. Los anticuerpos IgG duran toda la vida, sin embargo, con la medición de ELISA IgG indirecto revestido con antígenos de envoltura y membrana, es posible detectar un aumento cuadruplicado o mayor en los anticuerpos IgG en sueros pareados de fase aguda y de convalecencia para documentar infecciones recientes, y confirmar el paciente está ante una infección secundaria. También se utiliza un método de inhibición de ELISA (EIM) para detectar anticuerpos IgG dengue específicos, para el diagnóstico serológico y la vigilancia de los casos de dengue. Este sistema se basa en la competencia por los sitios de antígeno por parte de los anticuerpos IgG del dengue en la muestra y en el conjugado humano IgG anti-dengue. Este

método se puede usar para detectar anticuerpos IgG en suero o plasma y muestras de sangre almacenadas en papel de filtro, y permite la identificación de un caso como infección primaria o secundaria por dengue. Después de las infecciones virales, los anticuerpos recientemente producidos son menos ávidos que los anticuerpos producidos meses o años después de la infección. La avidez de los anticuerpos se usa en algunos laboratorios para distinguir entre las infecciones primarias y las secundarias del dengue. Dichas pruebas no se usan extensamente y no están disponibles comercialmente.¹⁵

¹⁵ OMR y ETR. Dengue: guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control. 2010, p. 1-151.

6. DISEÑO METODOLÓGICO

6.1 TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación es un estudio de intervención experimental, cuyo propósito es determinar la funcionalidad y dosis óptima de los anticuerpos a usar en un ELISA de detección de IgM, así como la reactividad cruzada de IgM humana plasmática específica para DENV durante una primoinfección, para la estandarización de un protocolo para detección de IgM humana plasmática específica para el virus del dengue mediante la técnica de ELISA, el cuál podría ser usado para la diferenciación y diagnóstico de individuos que estén cursando con infección primaria o subsecuente por el DENV, de una manera simple y rápida, evitando la realización de un ELISA de detección de IgG.

6.2 LUGAR

La investigación se desarrolló en el departamento del Huila, debido a que en dicha región existe un alto número de casos y se considera como zona endémica de dengue; además actualmente se encuentra en alerta epidemiológica debido al incremento de los casos, y encabeza los departamentos con el mayor número de casos de dengue a nivel nacional; adicionalmente hay que tener en cuenta que Huila es una zona con clima tropical propiciando condiciones adecuadas para la replicación del mosquito *Aedes Aegypti* y para su supervivencia.

6.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

Se estudiaron muestras de plasma de dos niños con infección aguda por el virus del dengue, diagnosticados de acuerdo a los criterios establecidos por la OMS, y confirmados por la detección de la proteína no estructural-1 (NS-1) y/o por ELISA de detección de IgM dengue-específica, y el serotipo infectante fue determinado por RT-PCR convencional. Dichas muestras hacen parte de una seroteca del laboratorio de Inmunología de la universidad Surcolombiana. Los padres firmaron el consentimiento informado de cada uno de los niños incluidos. Las características socioepidemiológicas de los niños incluidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características socio epidemiológicas de los pacientes.

| Paciente | Sev 56 | Sev 205 |
|------------------------------|------------|----------|
| Edad (meses) | 168 | 7 |
| Día de fiebre | 4 | 4 |
| Tipo de infección | Secundaria | Primaria |
| Serotipo infectante | DENV-2 | DENV-2 |
| NS1 en plasma (Panbio Units) | 19 | 32.1 |
| IgM en plasma (Panbio Units) | 22 | 37.6 |
| IgG en plasma (Panbio Units) | 38 | 7.6 |

Dos a cuatro mililitros de sangre venosa fue recolectada en tubos con EDTA. Dichos tubos fueron centrifugados a 300 x g, y el plasma fue recolectado y guardado a -70°C hasta el momento del análisis.

6.4 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

La técnica del presente proyecto de investigación son las mediciones biofisiológicas. En base a la lectura de distinta bibliografía se estableció un protocolo de ELISA para la detección de IgM humana plasmática específica para el virus dengue, dicho protocolo se sujetó a un análisis de variables para determinar las concentraciones óptimas de anticuerpos a usar en el experimento. El protocolo fue establecido como sigue:

6.4.1. Materiales

6.4.1.1. Reactivos

Pipeta monocanales de 1000, 200, 10, 5 uL y multicanales de 50 y 200 uL (BRAND)

Buffer salino fosfato (PBS) estéril (Cell Gro, Cat: 20-031-CV)

Tween 20 10% (ACROS, Cat. 23336-2500)
Leche descremada en polvo (Slight, Colanta, Lote 7)
Fragmento F(ab')₂ anti-IgM humana purificado de cabra (KPL, Cat:201-1003)
Lisado celular infectado con DENV-2 y mock
Anticuerpo anti-DENV-2 Clon 3H5-1, Lote 1-26-03
Dengue virus complex Monoclonal Clon M8051125 (Anti-DENV-4) (Fitzgerald, Cat: 10-D35)
Anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado purificado de cabra (KPL, Cat: 16-18-02)
Estreptavidina-Peroxidasa (KPL, Cat: 14-30-00)
Tetrametilbenzidina (TMB, KPL, Cat: 50-76-00)
Ácido Sulfúrico 2M (MERCK, Cat K38346532)
Placa de ELISA de 96 pozos de alta afinidad (NUNC, Cat: 44-2404-21)
Tubos Falcon de poliestireno 15 ml (BD, Cat: 352099)
Tubos Falcon de polipropileno 50 ml (BD, Cat: 352070)
Tubos eppendorf 1.5 ml
Recipiente para solución de lavado

6.4.1.2. Equipos

Incubadora (Heraus)
Lector de ELISA Multiskan FC (Thermo)

6.4.1.3. Muestra.

Plasma de niño con infección aguda por DENV-2, secundaria, Dx: Dengue severo.
Código: Sev56C.

6.4.2. Metodología

Cubrir los pozos de la placa de ELISA con fragmento F(ab')₂ anti-IgM humana purificado de cabra a una concentración de 2µg / ml (1/500) en PBS 1X; agregar 70 uL/pozo e incubar toda la noche a 4°C. Se cubren los bordes con 150 uL de PBS 1X.

Al día siguiente descartar la solución y agregar 150 uL de blotto 5% (solución de bloqueo= por pozo y 150 uL de PBS 1X en los bordes de la placa e incubar por 1 hora a 37°C.

Descartar la solución y agregar muestras (diluidas al 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 y 1/800 en Blotto 2.5%) y control negativo (Blotto 2.5%), 70 uL/pozo, según el mapa, y 150 uL de PBS 1X en los bordes de la placa. Incubar por 2 horas a 37°C.

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---------------|------|-------|-------|-------|---------------------|------|-------|-------|-------|---------------------|---------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | PBS 1X 150 uL | | | | | | | | | | | PBS 1X 150 uL |
| B | | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | |
| C | | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | |
| D | | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | CONTROL Blotto 2.5% | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | CONTROL Blotto 2.5% | |
| E | | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | CONTROL Blotto 2.5% | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | CONTROL Blotto 2.5% | |
| F | | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | |
| G | | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/800 | |
| H | PBS 1X 150 uL | | | | | | | | | | | PBS 1X 150 uL |

Lavar 4 veces manualmente con la solución de lavado (Tween 20 0,1% en PBS 1X). Agregar 70 uL/pozo de lisado celular infectado con DENV y mock (diluidos 1/10 en blotto 2.5%) y 150 uL de PBS 1X en los bordes de la placa. Incubar por 1 hora a 37° C.

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | PBS 1X 150 uL | | | | | | | | | | | PBS 1X 150 uL |
| B | | LISADO DENV-2 | |
| C | | LISADO MOCK | |
| D | | LISADO DENV-2 | |
| E | | LISADO MOCK | |
| F | | LISADO DENV-2 | |
| G | | LISADO MOCK | |
| H | PBS 1X 150 uL | | | | | | | | | | | PBS 1X 150 uL |

Lavar 4 veces manualmente con solución de lavado. Agregar 70 uL/pozo de anticuerpo anti-DENV-2 (Clon 3H5-1) y de dengue virus complex monoclonal (Clon M8051125) diluidos 1/100 (10 µg/ml), 1/500 (2 µg/ml) y 1/1000 (1 µg/ml) en blotto 2.5%, según el mapa, y 150 uL de PBS 1X en los bordes de la placa. Incubar por 1 hora a 37°C.

| | | | | | | | | | | | | |
|---|------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | PBS 1X 150 uL | | | | | | | | | | | PBS 1X 150 uL |
| B | 1/100 | 1/50 LISADO DENV-2 | 1/100 LISADO DENV-2 | 1/200 LISADO DENV-2 | 1/400 LISADO DENV-2 | 1/800 LISADO DENV-2 | 1/50 LISADO DENV-2 | 1/100 LISADO DENV-2 | 1/200 LISADO DENV-2 | 1/400 LISADO DENV-2 | 1/800 LISADO DENV-2 | |
| C | | 1/50 LISADO MOCK | 1/100 LISADO MOCK | 1/200 LISADO MOCK | 1/400 LISADO MOCK | 1/800 LISADO MOCK | 1/50 LISADO MOCK | 1/100 LISADO MOCK | 1/200 LISADO MOCK | 1/400 LISADO MOCK | 1/800 LISADO MOCK | |
| D | 1/500 | 1/50 LISADO DENV-2 | 1/100 LISADO DENV-2 | 1/200 LISADO DENV-2 | 1/400 LISADO DENV-2 | CONTROL Blotto 2,5% | 1/50 LISADO DENV-2 | 1/100 LISADO DENV-2 | 1/200 LISADO DENV-2 | 1/400 LISADO DENV-2 | CONTROL Blotto 2,5% | |
| E | | 1/50 LISADO MOCK | 1/100 LISADO MOCK | 1/200 LISADO MOCK | 1/400 LISADO MOCK | CONTROL Blotto 2,5% | 1/50 LISADO MOCK | 1/100 LISADO MOCK | 1/200 LISADO MOCK | 1/400 LISADO MOCK | CONTROL Blotto 2,5% | |
| F | 1/1000 | 1/50 LISADO DENV-2 | 1/100 LISADO DENV-2 | 1/200 LISADO DENV-2 | 1/400 LISADO DENV-2 | 1/800 LISADO DENV-2 | 1/50 LISADO DENV-2 | 1/100 LISADO DENV-2 | 1/200 LISADO DENV-2 | 1/400 LISADO DENV-2 | 1/800 LISADO DENV-2 | |
| G | | 1/50 LISADO MOCK | 1/100 LISADO MOCK | 1/200 LISADO MOCK | 1/400 LISADO MOCK | 1/800 LISADO MOCK | 1/50 LISADO MOCK | 1/100 LISADO MOCK | 1/200 LISADO MOCK | 1/400 LISADO MOCK | 1/800 LISADO MOCK | |
| H | PBS 1X 150 uL | | | | | | | | | | | PBS 1X 150 uL |

Anti-DENV-2, Clon 3H5-1
DENV Complex Monoclonal

Lavar 4 veces manualmente con solución de lavado. Agregar 70 uL/pozo del anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado purificado de cabra diluido 1/1000 en blotto 2.5% (0,5 mg/ml) y 150 uL de PBS 1X en los bordes de la placa. Incubar por 1 hora a 37°C. Lavar 4 veces manualmente con solución de lavado.

Agregar 70 uL/pozo de estreptavidina-peroxidasa diluida 1/1000 en blotto 2.5% (0,5 mg/ml) y 150 uL de PBS 1X en los bordes de la placa. Incubar por 1 hora a 37°C. Lavar 4 veces manualmente con solución de lavado.

Agregar 70 uL/pozo de TMB. Detener con 17,5 uL/pozo de ácido sulfúrico 2M. Leer la placa en el lector de ELISA a 450 nm

De acuerdo al análisis de los resultados se observaron las dosis óptimas tanto de de los anticuerpos Anti-DENV, que demuestren mejor funcionalidad en el experimento. Las diluciones con pozos densidad óptica doble o más altos que el

control negativo y tratados de forma simulada fueron considerados positivos. De igual forma se observó si los anticuerpos usados tienen reactividad cruzada con otros serotipos y se hizo un segundo experimento con las dosis establecidas como óptimas para probar la reactividad cruzada de la IgM específica para DENV presente en la muestra. Los resultados fueron usados para estandarizar un protocolo para la detección de IgM virus-específica presente en plasma mediante la técnica de ELISA. Se pretende que dicho protocolo sea usado posteriormente para comparar los niveles de IgM dengue específica entre niños con infección primaria, infección secundaria y niños sanos. De acuerdo a esos niveles, se espera que los niveles de IgM en el plasma de los niños sean útiles para diagnosticar cuando se está frente a una primoinfección o a una infección subsecuente por el virus del dengue.

6.5 INSTRUMENTO PARA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

Con el objetivo de crear el protocolo de detección de IgM dengue específica mediante ELISA, se elaboró un instrumento de medición donde se incluyeron datos como las densidades ópticas para cada uno de los pozos de la placa de ELISA. Dichos datos se recolectaron por medio de mediciones por la técnica de ELISA. Ver anexos.

6.6 PRUEBA PILOTO

Para el diseño del estudio piloto se realizaron dos pruebas de ELISA para detección de Inminglobulinas totales humanas, con el objetivo de familiarizarse con la técnica y el protocolo básico de detección de IgGs totales humanas en una muestra pool de inmunglobulinas plasmáticas, y de alcanzar una sensibilidad adecuada en la detección de dichas sustancias y lograr un afianzamiento en la interpretación de los resultados. Lo que se pretendía era realizar una serie de diluciones de la muestra pool de IgGs totales ($1/10^5$, $1/10^6$, $1/2 \times 10^6$, $1/4 \times 10^6$, $1/8 \times 10^6$, $1/1,6 \times 10^7$, $1/3,2 \times 10^7$, $1/6,4 \times 10^7$, $1/1,28 \times 10^8$, $1/2,56 \times 10^8$), con el propósito de alcanzar una dilución límite de detección de $1/3,2 \times 10^7$, lo cuál representaba una sensibilidad adecuada en la realización de la técnica de ELISA. En la primera práctica se usaron las dosis de inmunoglobulinas totales a las diluciones mencionadas anteriormente por duplicado cada uno y se comparó con el control negativo para cada dilución. Posteriormente se realizó la lectura mediante el lector de ELISA y se analizaron los datos bajo los parámetros de desviación estándar e intervalo esperado mediante el programa Microsoft Excel 2010 demostrando que había una baja variabilidad de los datos; y bajo los

parámetros de Pearson r , Valor P , R cuadrado e intervalo de confianza demostrando una correlación directa entre los datos y un adecuado nivel de confianza, donde los resultados eran estadísticamente significativos. El experimento fue interpretable, y se alcanzó la dilución límite, observando una adecuada sensibilidad y por lo tanto una familiarización con el protocolo de detección de Inmunoglobulinas totales.

Se realizó un segundo experimento, en el cuál igualmente se alcanzó la dilución límite, y se concluyó por lo tanto que la sensibilidad era apropiada y que el manejo de la técnica de ELISA era adecuado.

6.7 CODIFICACIÓN Y TABULACIÓN

La codificación y tabulación de las variables se realizó una vez se obtuvo los datos de las densidades ópticas de cada una de las diluciones de las muestras de plasma de niños con infección primaria y secundaria por dengue, Estos datos se compararon con controles negativos para asegurar la validez de los resultados. Cada una de las variables se analizó hallando el spearman r y valor P . Ver anexos.

6.8 PLAN DE ANÁLISIS

Se realizó un análisis de los resultados por medio de estadística inferencial debido a que se determinarán propiedades de la respuesta inmune de individuos que cursen con infección por virus del dengue, por medio de métodos y procedimientos que incluyen la toma de muestras de suero; la lectura de las densidades ópticas de las diluciones bajo la técnica de ELISA. El análisis estadístico se hizo por medio del software Microsoft Excel 2010, y GraphPad Prism[®] 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Los datos son presentados como media y las respectivas desviaciones estándar. El test de Mann-Whitney fue usado para comparar dos grupos independientes. Las asociaciones ente las variables fueron determinadas con el test Pearson. Un valor $P < 0,05$ fue tomado como significativo.

6.9 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Cumpliendo con la resolución 8430 de 1993 por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, el presente estudio se adhiere a las consideraciones éticas, como lo estipulan:

El *título I, artículo 4, literal a*: la presente investigación contribuye al conocimiento de los procesos biológicos en los seres humanos.

El *título II, capítulo 1, artículo 5*: en esta investigación prevalece el respeto a la dignidad del ser humano y la protección de sus derechos y su bienestar.

El *título II, capítulo 1, artículo 6*: la investigación se ajusta a los principios científicos y éticos que lo justifican; se fundamentará en la experimentación previa realizada en laboratorios o en otros hechos científicos; prevalece la seguridad de los beneficiarios y expresa claramente que los métodos no tienen riesgos (*artículo 11*) puesto que es un estudio que emplea técnicas y métodos investigación donde no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio, pues se usará como método una seroteca, cuyas muestras fueron recolectadas previamente con el debido consentimiento informado de los padres de los niños participantes del estudio.

El *título II, capítulo 1, artículo 8*: se protegerá la privacidad del individuo, sujeto de investigación sin exponerlo a ningún tipo de riesgos.

La toma de muestras que componen la seroteca que se usará para el presente estudio fue aprobada por el comité de ética en investigación en el acta N° 10 del 13 de Octubre de 2010.

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Dos niños de 7 y 168 meses de edad, hospitalizados en el Departamento de pediatría del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva Colombia, fueron incluidos. Ambos casos fueron clasificados como dengue severo de acuerdo a los criterios de la OMS de 2009. Las muestras de sangre venosa fueron tomadas en el día 4 de fiebre. Uno de los pacientes presentaba infección primaria y el otro cursaba con una infección secundaria. En ambos pacientes el serotipo infectante fue el DENV-2.

Para el desarrollo de ELISA de captura, se usó el plasma de un niño con infección secundaria por DEN-2. Las concentraciones del fragmento F(ab')₂ de IgM humana, Anticuerpo anti-IgG de ratón biotinilado purificado de cabra, y peroxidasa de rábano picante unida a estreptavidina, fueron optimizadas en trabajos anteriores. Por lo tanto se evaluaron diferentes concentraciones de anticuerpos murinos Anti-DENV. Las densidades ópticas obtenidas, una vez hecha la lectura en el lector de ELISA, se incluyen en la tabla 2.

Tabla 2. Densidades ópticas obtenidas en la lectura por espectrofotómetro. Azul: Anti-DENV-2, clon 3H5-1. Rojo: Anti-DENV-4, DENV complex Monoclonal.

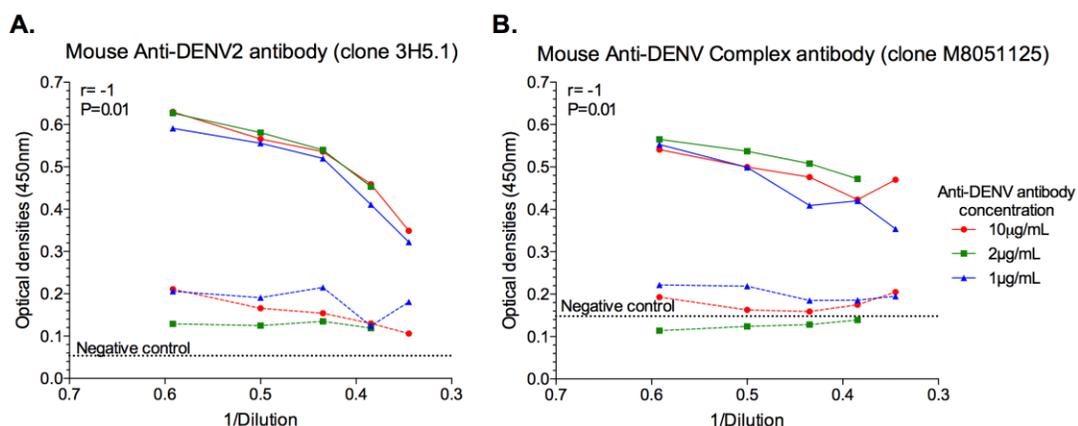
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 0.081 | 0.061 | 0.082 | 0.062 | 0.074 | 0.041 | 0.038 | 0.035 | 0.034 | 0.038 | 0.041 | 0.044 |
| B | 0.059 | 0.630 | 0.566 | 0.536 | 0.459 | 0.349 | 0.541 | 0.500 | 0.476 | 0.423 | 0.470 | 0.045 |
| C | 0.071 | 0.211 | 0.166 | 0.154 | 0.130 | 0.106 | 0.193 | 0.163 | 0.159 | 0.175 | 0.205 | 0.038 |
| D | 0.063 | 0.627 | 0.581 | 0.540 | 0.453 | 0.054 | 0.565 | 0.537 | 0.508 | 0.472 | 0.199 | 0.047 |
| E | 0.045 | 0.129 | 0.125 | 0.135 | 0.119 | 0.053 | 0.114 | 0.124 | 0.128 | 0.139 | 0.097 | 0.042 |
| F | 0.060 | 0.591 | 0.556 | 0.520 | 0.411 | 0.322 | 0.553 | 0.499 | 0.409 | 0.420 | 0.354 | 0.075 |
| G | 0.092 | 0.206 | 0.191 | 0.215 | 0.124 | 0.181 | 0.222 | 0.219 | 0.185 | 0.186 | 0.195 | 0.089 |
| H | 0.057 | 0.122 | 0.119 | 0.253 | 0.095 | 0.108 | 0.086 | 0.089 | 0.105 | 0.077 | 0.073 | 0.082 |

Como se muestra en la Figura 1, se evaluaron concentraciones de 10, 2 y 1 µg/ml de Anticuerpo murino anti-DENV-2 y del Dengue virus complex Monoclonal en blotto 2,5%, con la adición previa de DENV-2 o Mock (control negativo) en una dilución de 1/10 en blotto 2,5%. Como control negativo adicional se añadió blotto al 2,5% sin muestra.

En comparación con Mock y el control negativo, se obtuvo al menos el doble de las densidades ópticas (450nm OD) cuando se añadió DENV-2. Dichas densidades ópticas eran dosis dependientes, con una fuerte correlación negativa entre DO450nm y diluciones de plasma para todas las concentraciones de anticuerpos monoclonales de ratón probados (Pearson $r = -1$, $P = 0,01$), (Figura 1). Las concentraciones evaluadas del anticuerpo anti-DENV-2 (clon 3H5.1) y Dengue virus complex Monoclonal (clon M8051125) mostraron una dinámica similar en DO450nm (Figura 1A y 1B, respectivamente), por lo tanto, una concentración de $1\mu\text{g} / \text{ml}$ se seleccionó como la concentración óptima para posteriores experimentos.

Se confirmó además que el anticuerpo anti-DENV tiene reacción cruzada (Figura 1B), puesto que reconoce su inmunógeno original y también era reactivo contra DENV-2. En resumen, la detección eficiente de IgM dengue específica por ELISA de captura se obtuvo a altas diluciones de anticuerpos anti-DENV, y se confirmó que el Anticuerpo anti-DENV presenta reactividad cruzada con otros serotipos.

Figura 1. Determinación de las concentraciones funcionales de anticuerpos murinos anti-DENV. Se evaluaron diferentes concentraciones de Anticuerpos murinos anti-DENV-2 (clon 3H5.1) (A) y de un Dengue virus complex Monoclonal (clon M8051125) (B) Fueron evaluados por ELISA de captura para detección de IgM DENV-específica. La muestra de plasma de un niño con infección secundaria por DEN-2 confirmado inició a una dilución de 1/50 en blotto al 2,5%, y se diluyeron seriadamente al medio. El blotto al 2.5% fue usada como control negativo (líneas negras punteadas). Concentraciones de Anticuerpos murinos anti-DENV de $10\mu\text{g}/\text{mL}$ (líneas rojas), $2\mu\text{g}/\text{mL}$ (líneas verdes) y $1\mu\text{g}/\text{mL}$ (líneas azúles) fueron usadas después de adicionar DENV-2 (líneas continuas) y mock (líneas punteadas). Pearson r y el valor P se muestran para los pozos tratados con DENV-2.



Para probar la eficacia en la detección de IgM específica para DENV en plasma, se comparó nuestro ensayo con un kit de ELISA disponible comercialmente, en una dilución de plasma de 1/100. De acuerdo con los resultados obtenidos del kit comercial, los pacientes también fueron identificados como positivos para IgM DENV específica cuando se utilizó nuestro ensayo tanto con el anticuerpo murino anti-DENV2 (3H5.1 clon) y el Dengue virus complex Monoclonal (clon M8051125) (Figura 2). Además, se encontró una relación señal/ruido de fondo similar entre todas las pruebas probadas (Figura 2). En conjunto, el resultado apoya un adecuado rendimiento de los ensayos desarrollados.

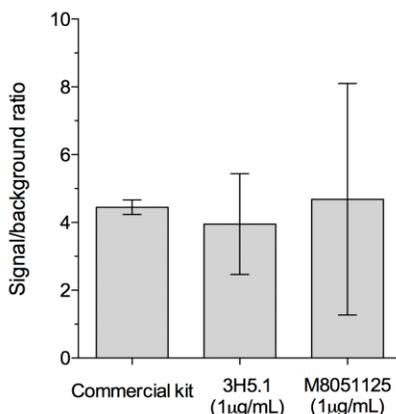
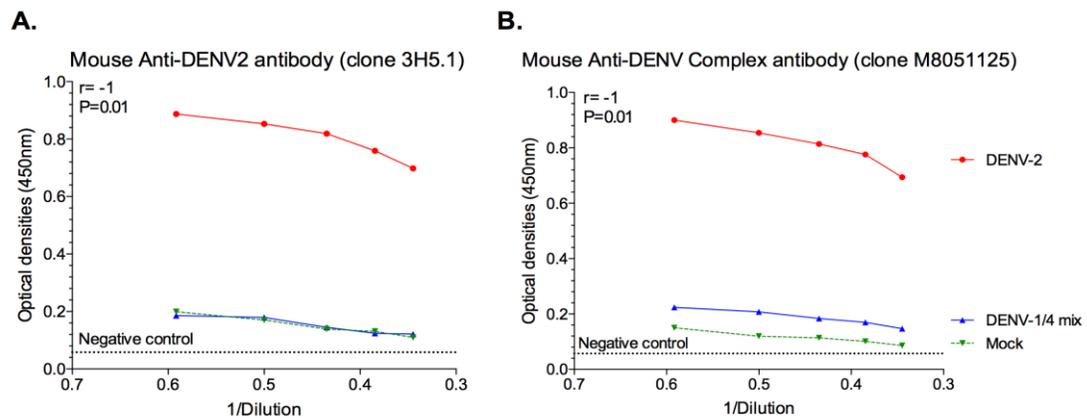


Figura 2. Comparación de la eficiencia entre el ELISA de captura para detección de IgM DENV-específica y Kit de ELISA disponible comercialmente. La IgM DENV-específica en plasma (a dilución de 1/100) de niños con infección por DENV-2 fue detectada usando un kit comercial de ELISA de captura para detección de IgM y el ELISA de captura desarrollado en el laboratorio, ambos fueron tratados con el anticuerpo murino anti-DENV-2 (clon 3H5.1; 1µg/mL) y el Dengue virus complex Monoclonal (clon M8051125; 1µg/mL). Se muestra la relación de las OD450nm obtenidas de las muestras y los controles negativos en cada ensayo (relación señal/ruido de fondo).

Luego de probar la eficiencia del ELISA de captura para detección de IgM DENV-específica durante una infección secundaria, se evaluó su desempeño en la detección de IgM DENV-específica en el plasma de un niño con infección primaria por DENV-2. El objetivo era probar si la IgM generada contra el virus del dengue era serotipo específica o tenía reactividad cruzada. Para esto, se usaron mezclas de DENV-2 y DENV-1/4 en el ensayo antes de la adición de anticuerpos murinos anti-DENV a la concentración optimizada. Como se muestra en la Figura 3, en comparación con mock y el control negativo, se obtuvo al menos el doble de DO450nm cuando las placas se trataron con DENV-2, pero no con la mezcla de DENV-1/4, tanto en la presencia de anticuerpo de ratón anti-DENV2 (clon 3H5.1) como en la presencia del Dengue virus complex Monoclonal (clon M8051125) (Figura 3A y B, respectivamente), y había una fuerte correlación negativa entre DO450nm y las diluciones plasmáticas (Pearson $r = -1$, $P = 0,01$). Por lo tanto, la IgM plasmática DENV-específica de un niño con infección primaria por el serotipo DENV-2, se unió preferentemente al serotipo infectante, y tuvo poca o ninguna reactividad cruzada con DENV-1 o 4.

Figura 3. La IgM serotipo-especifica para DENV fue detectada en infección primaria. Se evaluó el plasma de un niño con infección primaria por el serotipo DENV-2 por medio del ELISA de captura para detección de IgM DENV- específica usando un anticuerpo murino anti-DENV2 (clon 3H5.1) (A) y un Dengue virus complex Monoclonal (clone M8051125) (B). El plasma se adicionó a una dilución de 1/50 en blotto al 2,5%, y se diluyó seriadamente al medio. el blotto al 2.5% se usó como control negativo (líneas negras punteadas). Se usaron anticuerpos murinos anti-DENV a una concentración de 1µg/mL después de la adición de DENV-2 (líneas rojas punteadas), DENV-1 y 4 (líneas azules continuas) y mock (líneas verdes punteadas). Pearson r y el valor P se muestran para los pozos tratados con DENV-2.



8. DISCUSIÓN

En la presente investigación se evaluó el rendimiento de un ELISA de captura para la detección de IgM DENV-específica en plasma, tanto en infecciones primarias como en secundarias. Se demostró la eficiencia del ensayo, y se encontró que la IgM en el plasma de un niño con infección primaria era específica de serotipo.

Para el desarrollo del ELISA de captura se utilizó una muestra de plasma de un niño con infección secundaria por DENV-2 en su cuarto día de la fiebre (Tabla 1), debido a que hay claridad de acuerdo con informes anteriores que la IgM DENV-específica se genera temprano en infecciones secundarias. Se evaluaron Anticuerpos murinos secundarios anti-DENV, de los cuáles depende la detección de IgM DENV-específica en plasma en este protocolo de ELISA. De esta manera el anticuerpo murino Dengue Virus Complex Monoclonal (clon M8051125) brindó información acerca de la reactividad cruzada de serotipo (Figura 1B), y de la misma forma se incluyó para evaluar si la IgM generada contra en el DENV durante un infección primaria es serotipo específica o tiene reactividad cruzada.

Tanto el anticuerpo murino anti-DENV2 (tipo específico), como el Dengue Virus Complex Monoclonal, fueron evaluados a tres concentraciones diferentes (10, 2 y 1µg / ml, Figura 1). Una ventaja de este ELISA de captura es que es un ensayo semicuantitativo. Aquí, se utilizó diluciones seriadas al medio de muestras de plasma y, en comparación con los pocillos tratados con Mock y con control negativo, los pocillos tratados con DENV-2 tuvieron mayor DO450nm (al menos el doble de los pocillos tratados con Mock y control negativo), incluso a la dilución más alta de plasma (1/800) (Figura 1), lo que indica que en este ensayo probablemente no se obtuvo la dilución límite, pero sugiere una buena sensibilidad de los mismos. Por otra parte, a las concentraciones más bajas de anticuerpos monoclonales (1µg / ml), ambos anticuerpos murinos anti-DENV mostraron DO450nm similares a los de la concentración más alta (Figura 1), razón por la cual estas concentraciones fueron seleccionadas para este ELISA de captura.

La eficiencia del ELISA de captura evaluado para la detección de IgM DENV-específica en plasma se comparó con un ELISA disponible en el mercado en una dilución de plasma de 1/100, que es el recomendado por el fabricante de este kit. Cuando el rendimiento del ensayo evaluado se evaluó cualitativamente (Muestras de plasma positivas o negativas para IgM DENV específica) y cuantitativamente (relación señal/ruido de fondo), demostró ser comparable con el kit comercial (Figura 2), apoyando su eficiencia y utilidad en el diagnóstico de dengue.

Diversas investigaciones sugieren que la IgM generada durante una infección primaria es serotipo específica, sin embargo otras investigaciones han descrito una falta de correlación entre las respuestas de IgM y el serotipo del virus aislado. En este estudio se demostró que la IgM humana plasmática del niño con infección primaria por DENV-2 fue serotipo-específica, ya que sólo DENV-2, pero no los pocillos tratados con la mezcla-DENV-1/4, tuvieron mayor DO450nm en comparación con los pocillos tratados con Mock y control negativo (Figura 3).

En resumen, un ELISA de captura semicuantitativo para la detección de IgM DENV-específica se desarrolló y demostró ser eficiente y comparable con un kit comercial en la medición de la respuesta de IgM durante las infecciones primarias y secundarias en los niños. La IgM generada en la infección primaria era serotipo específica. El protocolo estandarizado podría ser útil para determinar la magnitud de la respuesta de IgM durante una infección por el virus del dengue y diferencias en esta respuesta podrían establecer cuando un individuo está cursando con una infección primaria o secundaria por el DENV.

9. CONCLUSIONES

Se desarrolló un ELISA de captura semicuantitativo para la detección de IgM DENV-específica y demostró ser eficiente y comparable con un kit comercial en la medición de la respuesta de IgM durante las infecciones primarias y secundarias en los niños.

La concentración óptima y funcional de Anticuerpo Anti-DENV fue de $1\mu\text{g} / \text{ml}$. Se confirmó que el Anticuerpo anti-DENV presenta reactividad cruzada con otros serotipos.

La IgM generada durante una infección primaria es serotipo específica.

Este trabajo fortalece la capacidad tecnológica e investigativa sobre dengue en el Huila.

10. RECOMENDACIONES

Se pretende que futuros estudios e investigaciones mejoren la sensibilidad del protocolo creado en esta investigación, puesto que aquí solamente se probó la eficiencia de dicho protocolo.

De igual forma se deben Determinar las diferencias cuantitativas entre nivel de IgM en infección primaria vs secundaria que sirva como marcador de diferenciación entre los dos tipos de infección.

Posteriores estudios podrían determinar si existen variaciones en los niveles de IgM plasmática dengue- específica dependiendo de la edad del individuo.

BIBLIOGRAFÍA

MOI, Meng Ling; et al. Detection of Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) by Using ELISA as a Useful Laboratory Diagnostic Method for Dengue Virus Infection of International Travelers. 2013. Journal of Travel Medicine. Vol 20, p. 185-193.

OSPINA, Marta Cecilia. Dengue: Diagnóstico por laboratorio. 2004. Infectio. Vol 8, p. 225-230.

VALDEZ, Jose Jhonatan; et al. Evaluación del sistema diagnóstico SD Dengue Duo para la detección de la proteína NS1 y los anticuerpos IgM e IgG anti-dengue. 2012. Rev Cubana Med Trop. Vol 64, p. 27-34.

ANEXOS

Anexo A. Instrumento de medición

Objetivo general:

- Desarrollar un protocolo para la detección de los niveles de IgM dengue-específica por ELISA, que eventualmente podría ser usado para determinar si la concentración IgM dengue-específica es diferente entre niños con infección primaria y secundaria por dengue.
1. Dosis óptimas de Anticuerpo Anti-DENV a utilizar en el experimento.

Anexo B. Codificación y tabulación

| ELISA PARA IgM HUMANA PLASMÁTICA ESPECÍFICA PARA VIRUS DENGUE | | | | |
|--|-------------------------------------|-----------------|------------|---------|
| Anticuerpo ANTI- DENV-2 | | | | |
| Diluciones de Anticuerpo Anti-DENV2 | Diluciones de IgM plasmática humana | Densidad óptica | Spearman r | Valor P |
| 1/100 | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| 1/500 | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| 1/1000 | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| 1/100 Mock | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| 1/500 Mock | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| 1/1000 Mock | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| Anticuerpo ANTI- DENV-4 | | | | |
| Diluciones de Anticuerpo Anti- | Diluciones de IgM plasmática humana | Densidad óptica | Spearman r | Valor P |

| | | | | |
|-------------|-------|--|--|--|
| DENV4 | | | | |
| 1/100 | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| 1/500 | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| 1/1000 | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| 1/100 Mock | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| 1/500 Mock | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| 1/1000 Mock | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |

| ELISA PARA IgM HUMANA PLASMÁTICA ESPECÍFICA PARA VIRUS DENGUE | | | | |
|--|-------------------------------------|-----------------|------------|---------|
| Anticuerpo ANTI- DENV-2 Diluido 1/1000 | | | | |
| Serotipo del lisado celular infectado | Diluciones de IgM plasmática humana | Densidad óptica | Spearman r | Valor P |
| DENV-2 | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| Mock DENV-2 | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| DENV-1,4 | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| Mock DENV-1,4 | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| Control | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| Anticuerpo Anti-DENV-4 dilucido 1/1000 | | | | |
| Serotipo del lisado celular infectado | Diluciones de IgM plasmática humana | Densidad óptica | Spearman r | Valor P |
| DENV-2 | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |

| | | | | |
|---------------|-------|--|--|--|
| Mock DENV-2 | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| DENV-1,4 | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| Mock DENV-1,4 | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |
| Control | 1/50 | | | |
| | 1/100 | | | |
| | 1/200 | | | |
| | 1/400 | | | |
| | 1/800 | | | |

Anexo C. Cronograma de actividades

| Tiempo \ Actividades | 2014 | | 2015 | | | | | | | | | | | |
|--|------|-----|------|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Nov | Dic | En | Fe | Mar | Ab | May | Jun | Jul | Ago | Sep | Oct | Nov | Dic |
| Anteproyecto | X | | | | | | | | | | | | | |
| Revisión bibliográfica | | | | X | | | | | | | | | | |
| Formulación del marco teórico | | | | X | | | | | | | | | | |
| Diseño del instrumento | | | | X | | | | | | | | | | |
| Ensayos en la técnica de ELISA | | | | X | X | X | X | X | X | | | | | |
| Estandarización de protocolo para detección de IgM dengue específica | | | | | | | | | | X | X | X | | |
| Revisión de resultados | | | | | | | | | | | | | X | |

Anexo D. Presupuesto

| MATERIALES | TOTAL EN PESOS |
|---|----------------------------------|
| 1. Pipetas monocanales | Proporcionado por el laboratorio |
| 2. Buffer salino fosfato estéril | Proporcionado por el laboratorio |
| 3. Lugol | Proporcionado por el laboratorio |
| 4. Tween 20 10% | Proporcionado por el laboratorio |
| 5. Leche descremada en polvo | Proporcionado por el laboratorio |
| 6. Fragmento F(ab') ₂ Anti-IgM humana | Proporcionado por el laboratorio |
| 7. Lisado celular infectado con el virus del dengue | Proporcionado por el laboratorio |
| 8. Anticuerpo anti-DENV2 clon 3H5-1 | Proporcionado por el laboratorio |
| 9. Dengue virus complex monoclonal clon M8051125 | |
| 10. Anticuerpo anti-IgG de ratón biotilnado purificado de cabra | Proporcionado por el laboratorio |
| 11. Esptreptavidina peroxidasa | Proporcionado por el laboratorio |
| 12. Tetrametilbenzidina | Proporcionado por el laboratorio |
| 13. Ácido sulfúrico 2M | Proporcionado por el laboratorio |
| 14. Placas de ELISA de 96 pozos de alta afinidad | Proporcionado por el laboratorio |
| 15. Tubos Falcón poliestireno 15 ml | Proporcionado por el laboratorio |
| 16. Tubo falcón de polipropileno 50 ml | Proporcionado por el laboratorio |
| 17. Tubos ependorf 1.5 ml | Proporcionado por el laboratorio |
| 18. Recipiente para solución de lavado | Proporcionado por el laboratorio |
| 19. Lector de ELISA multi scan | Proporcionado por el laboratorio |
| 20. Incubadora | Proporcionado por el laboratorio |
| 21. Muestras: plasma de niños infectados por virus del dengue. | Proporcionado por el laboratorio |

Anexo E. Operacionalización de variables

| VARIABLE | DEFINICIÓN | INDICADORES O CATEGORÍAS | NIVEL DE MEDICIÓN | ÍNDICE |
|------------------------------|---|--|-------------------|-------------------|
| Densidades ópticas | Densidades ópticas de cada uno de los pozos de la placa de ELISA medidos por el espectrofotómetro | Densidad óptica detectable a una longitud de onda de 450 nm | Razón | Absorbancia (D.O) |
| Dosis óptimas de Anticuerpos | Dosis de anticuerpos IgG anti-DENV con mejor funcionalidad en el experimento | Dosis adecuada de IgG anti-DENV para detección de DENV unido a IgM | Razón | Dilución límite |